中華農業研究 (Jour. Agric. Res. China) 50(2): 67～77 (2001)

金花石蒜化學誘變處理之研究[1]

許華欣[2] 黃麗春[3] 劉邦基[2] 鄭櫻慧[2] 張有明[2] 蕭吉雄[2]

摘要：本試驗利用金花石蒜生長點所誘發不定芽的芽原體爲材料，以Ethyl methane sulfonate (EMS)，秋水仙素，5-Azacytidine (azaC) 爲處理之藥劑，於86年12月進行不同濃度及不同時間的誘變處理，條件如下：0.05、0.5、5、50mM azaC處理一天；0.1、0.2、0.5% EMS處理一小時以及0.1、0.2%秋水仙素各處理一天與四天；接著於89年5月進行以0.05、0.1、0.2%秋水仙素處理芽原體1、2、4天之另一誘變試驗。在86年12月試驗，組培苗再生與變異比例結果發現，誘變處理一個月後，組培苗之再生率以0.5mM azaC處理一天爲最高 (52%)，0.2%秋水仙素處理一天最低 (2.5%)；將存活之誘變組培苗，進行外表性狀調查，發現部份具有葉基部白化、葉捲曲、葉片粗厚等現象，各處理均有超過50%的可視變異機率，以50mM azaC與0.2%秋水仙素處理一天最高（超過90%），對照組（未經誘變處理者）亦有5%的可視體細胞變異。金花石蒜因生育緩慢，自播種至開花約需5 - 6年[5]，組培苗出瓶後於溫室栽培，亦需約4 - 5年才可達開花階段[10]，花朵變異部分需較長時間才能進行篩選。現階段先進行誘變株的染色體觀察，結果發現大部分受測單株的染色體數符合2n = 2x = 14，然89年5月處理秋水仙素部分，則有鑲嵌倍數體 (polidy chimeras) 的現象，且細胞間多倍體的比例較二倍體高。另外，誘變組培苗健化出瓶之性狀調查，於田間網室發現在0.5mM azaC一天處理者有葉色鑲嵌與全葉呈淡黃綠色之葉色變異單株。因此，對照染色體數不變，單株葉色產生變異之情形下，推測誘變處理可能引致染色體內基因組的變異。

關鍵詞：金花石蒜、化學誘變劑、染色體分析。

前　言

金花石蒜 (*Lycoris aurea* Herb) 爲石蒜科 (Amaryllidaceae) 石蒜屬 (Lycoris) 多年生有膜鱗莖類球根花卉[5]，原產於台灣、緬甸、中國大陸、日本及韓國[2, 5]。台灣的產區以淡水楓樹湖爲最大，約有40公頃，另外，在苗栗南庄、台中后里與東勢地區，亦有零星種植[5]。金花石蒜之花色金黃呈漏斗狀，花梗挺直可著花5 - 10朵，且花莖不帶葉片，直立於地面，又名忽地笑；由於花型纖細，小蕊花瓣交錯，又名龍爪花，英名爲蜘蛛百合 (spider lily)[9]。金花石蒜因有優美的花色與花型，成爲廣受消費者喜愛的本土原生球根花卉，可惜此種花卉較缺乏遺傳變異性，以致栽培品種流於單一，產品缺乏變化，加以產期過於集中，難以滿足消費者需求，嚴重限制其市場競爭力與產業發展前景。因此，本研究對金花石蒜進行化學誘變處理，以提高變異機率[1, 27]，期能藉此增加品種多樣性，增進其市場競爭力。可供化學誘變之藥劑有多種，下列三種爲較常用者：(一) 5-azacytidine (5-aza-CR[20, 21], 5-Azt[15], azaC[13, 14, 31]

---

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第2069號。
2. 本所園藝系助理、副研究員、助理研究員、助理研究員、研究員兼系主任。臺灣省　台中縣　霧峰鄉。
3. 中央研究院植物所研究員。台北市　南港區。

)，屬於胞嘧啶類似物，經鍵結甲基轉化酶 (methyltransferase)，造成基因去甲基化作用(demethylation) 後，可使一些靜態基因 (silent genes) 重現活力，進而影響作物外表型的表現[20, 21]。目前，利用azaC藥劑在植物誘變株系之培育上，已有矮化品種的育成[16, 31, 32]；其他性狀改變方面，如改變株高、縮短成熟年限、增加分蘗數等[19]；此外，此藥劑用於轉殖試驗時可維持轉基因 (transgene) 的活性[14, 29]；(二) 乙基甲磺酸鹽 (ethyl methane sulfonate, EMS) 為烷化劑 (alkylating agent) 的一種，其化合物含一個至一個以上的烷基可與DNA的鹼基或磷酸基結合，改變DNA結構或導致染色體斷裂，因而造成植物在遺傳上或外表型發生變異[4, 11, 12]；(三) 秋水仙素 (colchicine) 可誘導植物染色體倍加，對植物產生不可預期的變異，使植物外表型產生葉色濃綠、葉片粗厚，莖部變粗，花朵大小改變等現象[33]。

本試驗利用5-azacytidine (azaC)、EMS以及秋水仙素等化學誘變劑處理金花石蒜不定芽之芽原體，並配合組織培養技術進行誘變育種，主要藉由誘變劑的作用，再加上組織培養可能產生的體細胞變異 (somaclonal variation)[22, 28]，增加突變個體發生的種類及機率，期能加速變異育種的速度。

材料與方法

一、金花石蒜芽原體之化學誘變處理

首先自淡水產地購得休眠種球，根據黃和劉[8, 26]的方法，切取近生長點中心之雙鱗片，約4×5mm，從事不定芽誘導及植株分化，再切取試管植株之生長點進行培養[9]，生長點生長發育後，以之為培植體，誘導不定芽之分化，於不定芽之芽原體 (bud primordia) 分化時，進行化學誘變劑處理。材料於86年12月5日開始進行試驗，其處理條件包括：(1) 以0.1、0.2% 秋水仙素處理1天與4天，(2) 以azaC 0.05、0.5、5、50mM處理1天，(3) 以0.1、0.2、0.5% EMS處理1小時，(4) 以0.05, 0.1, 0.2% 秋水仙素各處理1、2、4天（89年5月重複秋水仙素處理）以及不做任何處理的對照組。每處理含40個不定芽原體之培植體。處理誘變劑後，以無菌水沖洗3 - 5次，藉以清除殘毒，提高存活機率[12, 24]，再移植至分化培養基中。

二、誘變培植體之再生培養

誘變組培苗之培養，係根據黃和劉[8, 26]以及黃[9]之方法，以MS的配方，添加不同濃度的NAA與BA，促使誘變株長芽與發根。培養於光強度2,500 Lux，溫度25 - 27℃恆溫的環境中，每天光照16小時。處理後之培植體，每7日調查芽體分化及芽體外型變異，共調查4次。

三、誘變培植體之染色體分析

染色體分析方法，係根據黃[25]所發表利用地衣紅 (orcein) 染色方法。取長約5mm的無菌苗根尖，分別置於Chloro IPC中90分鐘，以蒸餾水洗淨後，再浸於propionic acid-alchohol中30分鐘，之後貯於70% 酒精中。染色前，將根尖自70% 酒精中取出，浸入10% HCl中20分鐘，再用55℃蒸餾水洗滌五次，將根尖自蒸餾水中取出，以濾紙吸乾，再滴一滴orcein染劑至根尖。將根尖置於解剖顯微鏡下，去除根冠，並於載玻片上打散分生細胞，再滴一滴染劑之後，將細胞均勻壓開，再壓扁封片，於光學顯微鏡 (Nikon OPTIPHOT-2) 下觀察染色數，再以320×條件進行染色體之拍照。

四、誘變組培苗之出瓶繁殖

試驗經化學誘變劑處理所得之組培苗，經由長芽與發根之誘導後，在每球平均2 - 3片葉子（圖2A）的情形下，將各單株進行出瓶的繁殖工作。取出試管內之誘變組培苗，進行根系間洋菜的清洗，接著浸泡殺菌劑，再將各單株種植於含硅石之黑色塑膠軟盆中，放置在溫度控制在25/20℃（日/夜溫）生長箱中約2週後，將各單株移植至田間網室內，並將成長之種球移植至較大的黑色塑膠軟盆中。各單株並於一年後，移植至田間網室之畦床（長×寬×高＝18公尺×1公尺×45公分；介質為硅石：泥碳土=3：2）內，並定期進行灌溉、施肥、病蟲害防治與外表性狀調查。

結　果

一、不同種類與劑量之化學誘變劑處理金花石蒜培植體再生的影響

誘變處理培植體之再生情形，依不同種類誘變劑處理與處理劑量而異。以86年12月處理部份爲例，誘變培植體之再生情形在azaC處理以50mM最低，僅達3.3 %，0.5mM最高，達52 %。EMS處理之再生情形，0.2%處理者於處理後兩個月，全部褐化死亡，而再生率介於4.9至31.7%之間，秋水仙素處理方面，不同濃度處理4天部份，於處理後1個月全數死亡，而處理1天部份，其再生率以0.2%處理者之2.5%爲最低。此結果顯示，劑量與再生比例呈反比（圖1）。

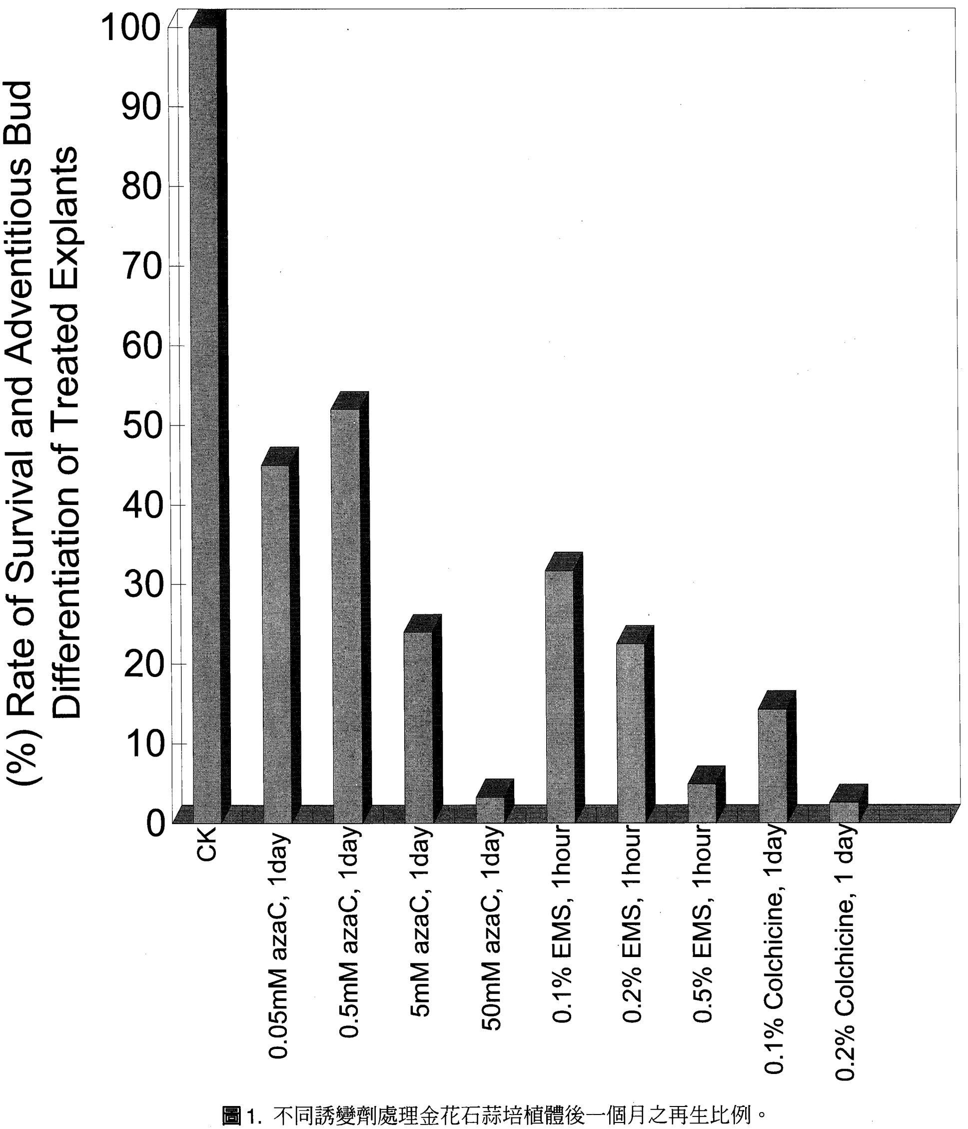

圖1. 不同誘變劑處理金花石蒜培植體後一個月之再生比例。

Fig. 1. The regeneration rate of *L. aurea* explants one month after treatment with different mutagens.

二、誘變處理組培苗之外表型可視變異情形

經誘變處理存活之組培苗，部份具有外表型的變異，例如葉基部白化、葉捲曲、葉片粗厚等現象（圖2）。每個誘變處理均有高過50%的可視變異率，其中以50mM azaC 與 0.2% 秋水仙素處理一天者最高，達到90%以上，對照組亦有5%的可視體細胞變異（圖3）。

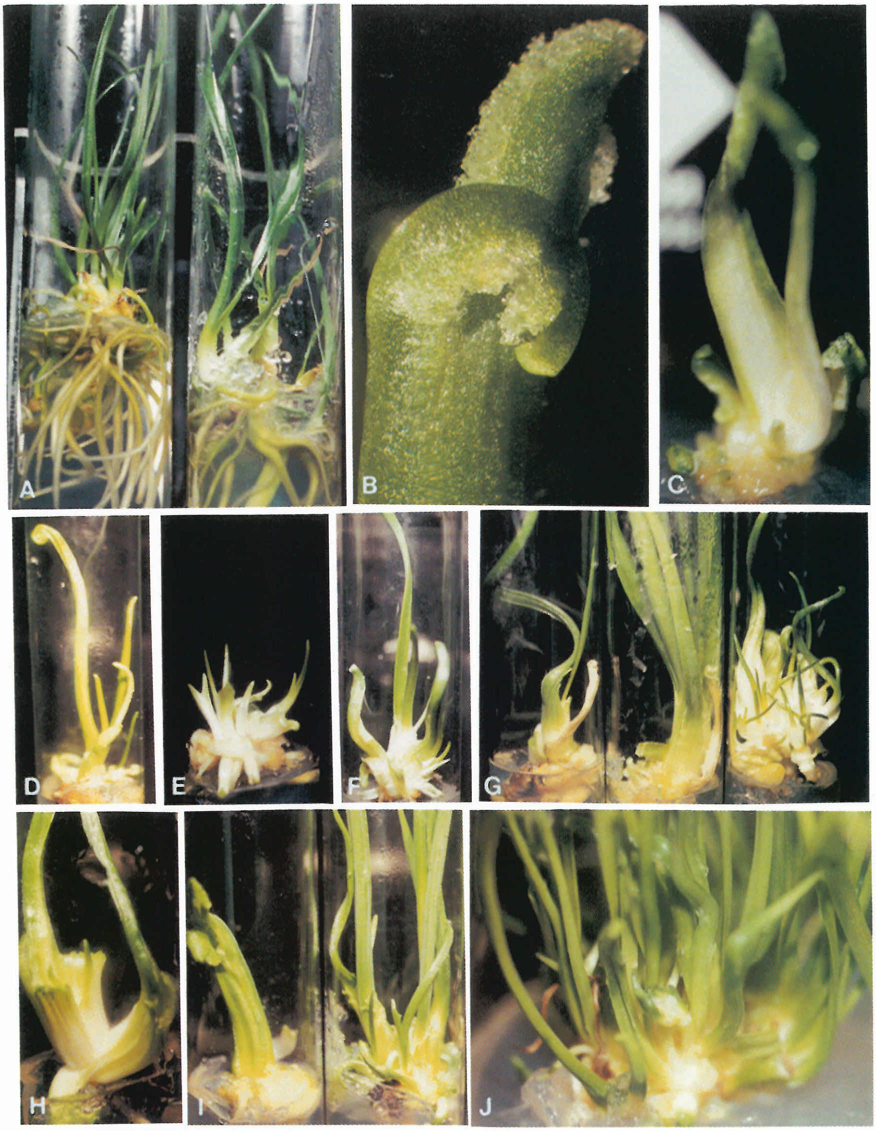

圖2. 經不同誘變劑處理後兩個月，金花石蒜培植體外表型變異的情形。(A)對照組，未經處理化學藥劑。(B)(C)經0.1% EMS處理一小時。(D)經0.1%秋水仙素處理一天。(E)(F) 0.05mM azaC處理一天。(G) 0.5mM azaC處理一天。(H)(I)(J) 5mM azaC處理一天。

Fig. 2. The phenotypic variation of *L. aurea* explants after treated with different mutagens. (A) CK, control without chemicals treated. (B)(C) 0.1% EMS treatment for 1 hour. (D) 0.1% colchicine treatment for 1day. (E)(F) 0.05mM azaC treatment for 1 day. (G) 0.5mM azaC treatment for 1 day. (H)(I)(J) 5mM azaC treatment for 1 day.

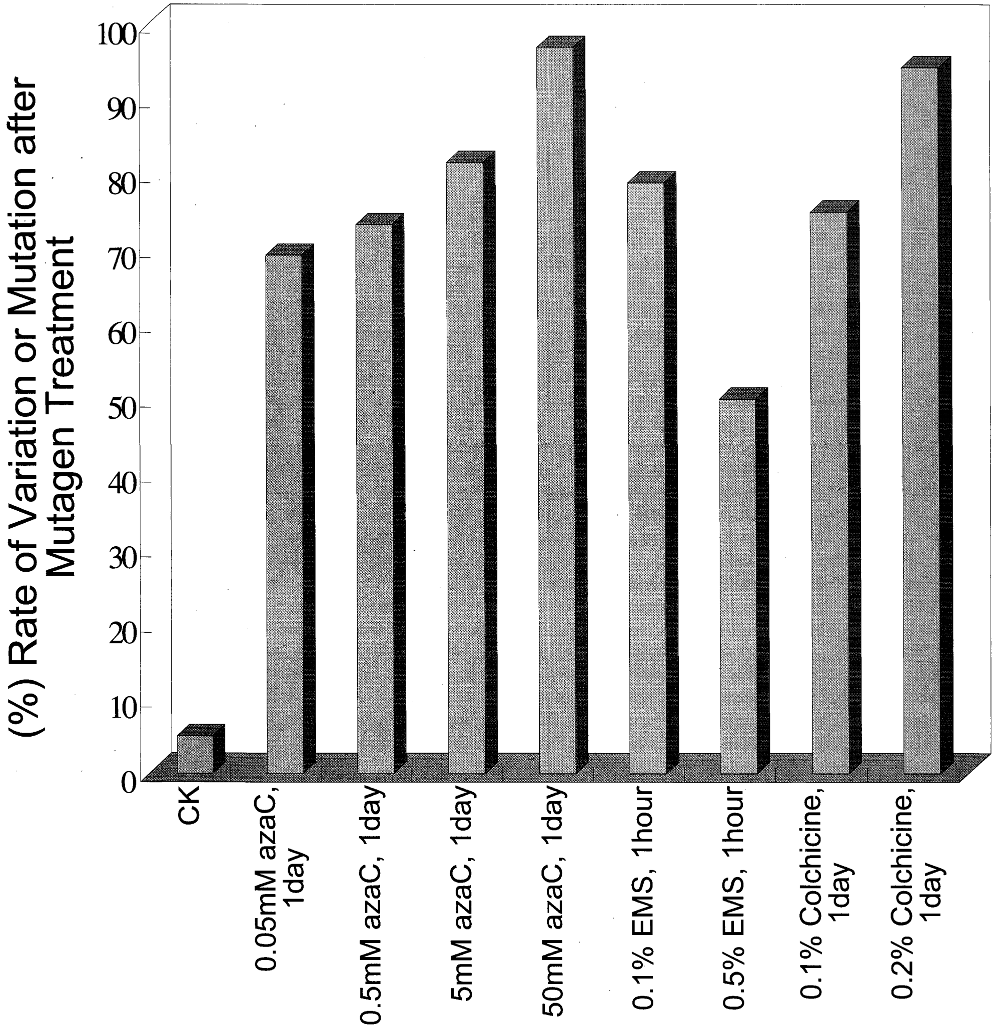

圖3. 不同誘變劑處理金花石蒜培植體之變異比例。

Fig. 3. The mutation ratio of *L. aurea* explants treated by various mutagens.

三、誘變處理植株之染色體分析

由於金花石蒜的營養生長期過長，從種子播種至開花約需5 - 6年的時間[5]，爲求於短期內探測其變異情形，於組培苗出瓶後，各處理逢機選取5株，每株取5個根尖進行染色體分析。於86年12月處理部分，發現所取樣之根尖細胞染色體分析證實大致符合2n = 2x =14（圖4），而89年5月重複進行秋水仙素處理部分，於受測細胞內發現各種倍數染色體的出現，即雙倍體、四倍體與多倍體共存於同一根尖的現象，但0.05與0.1%處理1天的細胞其二倍體的比例較高於四倍體與多倍體者（約54.5-87.2%）；但其餘處理所採樣的根尖細胞染色體檢查，四倍體與多倍體的比例均高於二倍體的比例，其中於0.2%秋水仙素處理4天之單株，發現2n = 10x - 2 = 68，呈非整倍體 (aneuploid)（圖4）的表現。

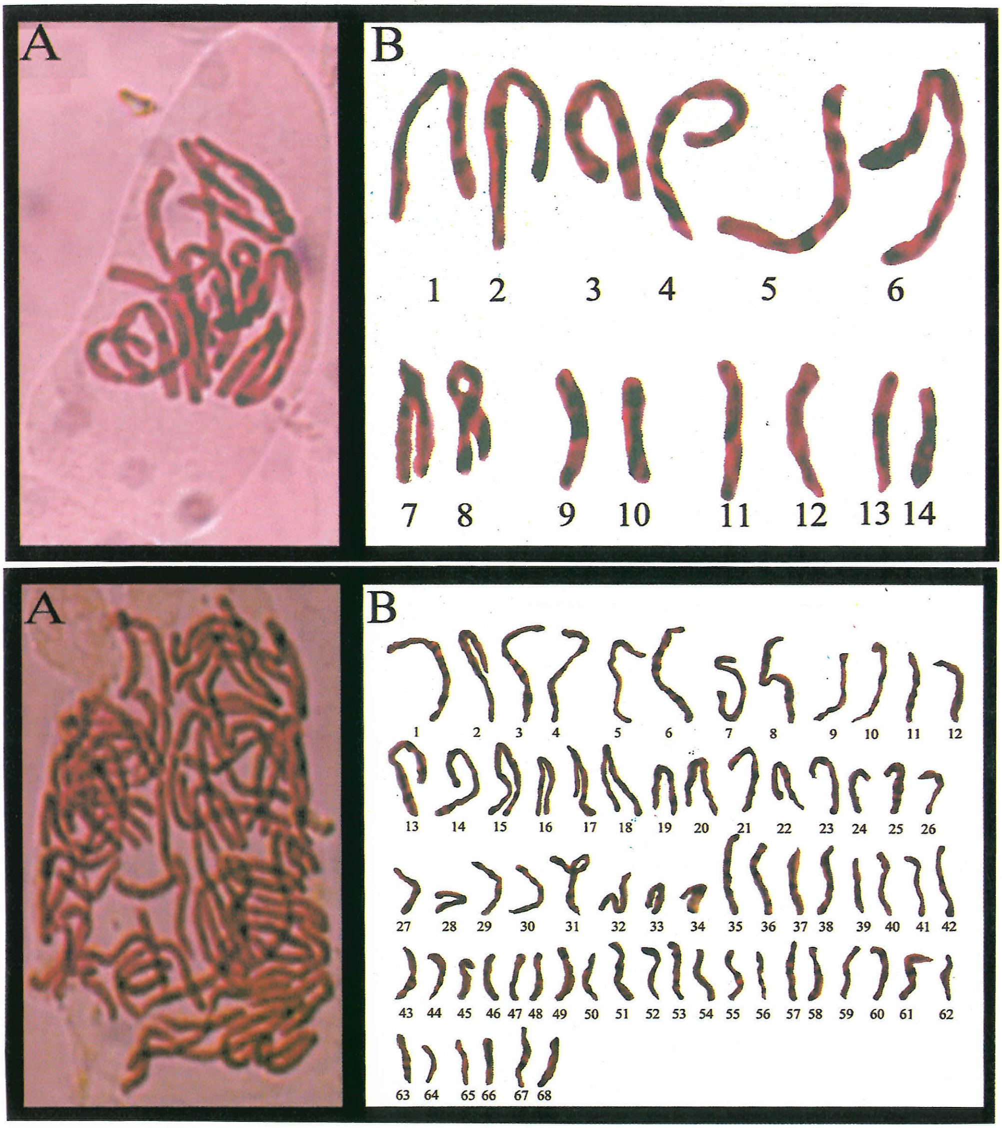

圖4. 金花石蒜之染色體輿圖分析。上圖，對照組之染色體輿圖。下圖，0.2%秋水仙素處理四天之擬誘變株之染色體輿圖。(A)染色體在細胞內之分布情形。(B)培植體之染色體數。

Fig. 4. The chromosome analysis of putative mutagenic plants detected from root tips. Upper: A karyotype of CK (without chemicals treatment). Lower: A karotype of putative mutant (with 0.2% colchicine treatment for 4 days). A: The chromosome feature. B: The chromosome number of mutagenic plant.

四、誘變單株出瓶後之繁殖情形與變異調查

試驗於不定芽之芽原體分化時，各取40個培植體進行化學誘變劑處理，各誘變組培苗經長芽與發根誘導後，在每球平均2 - 3片葉子（圖2A）的情形下，進行健化處理，再移植到田間網室中，共計移出840株。各處理出瓶株數，分別是0.05、0.5、5、50mM azaC處理者分別出瓶391、269、101以

及5株；而0.1%、0.5% EMS出瓶株數各為15、13株；另外，0.1%與0.2%秋水仙素處理者的出瓶數則各為5與6株。

種植於田間網室之誘變單株，經兩個生長週期，於單株統計葉數發現可達開花球階段（實生五年生球，每球8-10片葉子）[2, 5]之種球比例分別是，對照組的16.7%，不同濃度處理之azaC部份，約為8.3%以上，不同濃度EMS處理部份也佔有15.9%以上的比例，而不同濃度秋水仙素處理者，生育較差，並無達每球8-10片葉的階段。所有處理單株的葉數統計，大約介於4 - 7片葉間，比例高達61%以上。此數據與文獻[2, 5]所提之繁殖年限相比較，試驗初步可達縮短該作物的生長年限的效果。另外，葉色變異方面，於0.5mM azaC處理一天之單株中發現，葉色全部淡黃綠色，以及葉色淡黃綠色與綠色鑲嵌之單株（圖5）。

圖5. 0.5mM azaC處理一天之M1誘變單株外表型的變異情形。

Fig. 5. The M1 phenotypic variation of Lycoris aurea plants with 0.5mM azac treatments for 1 day. Left: Whole leaf variation (light yellow green). Right: Mutant variegated leaves with green and light yellow green.

討　論

一、誘變培植體之再生情形

本試驗所用藥劑，主要作用為影響核酸複製與蛋白質合成，並可改變染色體，進而使供試材料之遺傳組成發生變異[12, 18, 31]。但藥劑的毒性作用，可能導致生長受阻與死亡[15]。在本試驗中，隨著濃度的提高，誘變培植體再生比例相對降低（圖1），其中，於86年12月處理部份，以秋水仙素(0.1, 0.2 %)處理四天與0.2% EMS處理1小時者的再生情形最差，分別於處理後一個月與兩個月，全部褐化死亡；而0.2%秋水仙素處理一天之再生率僅2.5 %，此等現象極易以上述原因加以理解。與此類似的結果在

其他作物之研究中亦可得到印證，例如不同濃度的azaC處理煙草癒合組織 (micro-callus) 與小苗時，提高藥劑濃度，可使培植體褐化，芽體發育與根形成受阻，進而發育停止以至死亡[15]。Fu等人[17]利用不同濃度的EMS和秋水仙素以不同時間處理蘋果與櫻桃時，亦發現誘變培植體存活比例與誘變劑處理之濃度和時間呈現負相關之關係。此外，種子對誘變劑的忍受程度也有類似的結果，李與李[3]在利用EMS, DES (Di-ethyl sulphate), NMU (N-nitroso-N-methyl urethane) 及SA (Sodium azide) 處理大麥與玉米種子時，發現在所用之不同藥劑中，EMS對種子發芽有顯著的抑制作用。van Tuyl等人[33]以0.05 - 0.1% 秋水仙素處理百合的鱗片以及納麗石蒜的培植體，發現在百合方面有抑制再生的現象，而在納麗石蒜，則除了抑制小子球 (bulblet) 再生，更會進而發生致死反應。這些現象皆與本試驗的結果相符。

二、誘變培植體之外表型變異情形

本試驗結果顯示化學誘變劑會引發核酸層面的變異，並於組培苗階段發現葉基部白化、葉捲曲、葉片粗厚以及植株簇生狀等現象，而且每個處理都有超過50 %的變異率，遠高於對照組之體細胞變異機率 (5%)。此外，誘變組培苗經健化、出瓶並種植於田間網室中，發現0.5mM azaC處理者有鑲嵌葉色與葉色改變等葉色變異的現象（圖5）。根據李與李[3]的報告，玉米種子經過EMS處理，可導致分蘗異常、植株矮化、穗從基部長出、葉片皺縮捲曲、無莖植株以及雌雄同穗等異常現象，本試驗亦有相似之結果。此外，van Tuyl等人[33]利用秋水仙素處理百合的鱗片時，發現不同倍數染色體鑲嵌的現象，例如雙倍體與四倍體，雙倍體與八倍體以及四倍體與八倍體的鑲嵌。King[23]利用花椰菜、青花菜與芥藍爲材料，處理azaC時，發現誘變株生長受抑制，其葉片大小、寬度、厚度、表面質地、根的發育等，均受影響，致使植株呈簇生狀，甚至改變花瓣的形狀，影響花藥與花粉的形成。Phillips等人[30]在探索植物組織培養的遺傳不穩定性時，指出植物基因的去甲基化，容易造成染色體的變異或斷裂，因而造成植株外表型的變異，此一機制與原理或可用以解釋本試驗之結果。

而植物組織培養造成變異方面，由於培植體本身所預先存在的遺傳變異，培養基內所含的化學成分誘發的變異反應以及由組織培養之培養條件所造成的逆境，均有可能促使植物體本身基因或染色體的改變而造成體細胞變異[22, 28]。本試驗未經化學藥劑處理之對照組約有5% 的變異，在此得到驗證。另外，台灣香蕉研究所利用組培苗所發生的體細胞變異，進行抗黃葉病變異株系的篩選[6]，並從選出之抗黃葉病優良品系，育成台蕉一號品種[7]。由此推測，本試驗利用生長點培養之培植體進行誘變處理，並利用組培技術進行維持的工作，更提高誘變發生的機率，顯係一可行的途徑。

三、誘變培植體之分子變異情形

由於金花石蒜組培苗出瓶後於溫室栽培，需經歷4 - 5年始可達開花期[10]，爲提前探討誘變效果，試驗除了觀察其外表性狀，並經由染色體分析進行分子變異追蹤。首先在86年12月處理的部分，進行抽樣染色體分析，並觀察抽樣之根尖染色體大致爲 $2n = 2x = 14$，但誘變後之組培苗有外表型變異的現象。此現象在李與李[3]利用EMS等化學藥劑處理大麥與玉米種子時，並無發現染色體的變異，但出現細胞變異的現象，頗爲類似。另外，試驗在89年5月之秋水仙素處理部分，發現各細胞間有倍數體鑲嵌的現象；且除了0.05與0.1% 處理1天者以外，其餘處理的抽樣細胞之多倍體比例均大於正常二倍體的比例，而 $2n = 10x - 2 = 68$ 的單株就是在0.2% 秋水仙素處理4天所發現（圖4）。此現象對照van Tuyl[33]等人的多倍體誘導實驗中，提到秋水仙素處理與另一藥劑-oryzalin做比較時，毒性較強，死亡率較高且對多倍體的誘導也較不穩定，它會使百合出現鑲嵌倍數體 (ploidy chimeras) 的現象，且多數屬於邊緣嵌合體 (mericlinal chimeras)，誘變株最終將趨於單一種倍體數表現；另有文獻指出植物材料經由化學誘變劑處理可造成區域專一性 (regional specificity) 的染色體斷裂，進而導致染色體數變異不穩定的現象[12]，這或可解釋試驗中染色體數倍數異常的現象，但試驗仍需進行更進一步的研究。接著探討到azaC之主要機制，爲活化基因，進行基因去甲基化，可在DNA複製時取代胞嘧啶，鍵結甲基轉化酶，使基因行去甲基化作用，進而影響基因的表現[20, 21]，其影響的範圍似應侷限在基因的層次，基於

此原因，我們所觀察誘變株染色體數不變，但部分單株卻出現外表型的變異，實為一合理現象。

四、誘變組培苗之田間繁殖情形

誘變組培苗經健化後，種植於田間網室，歷經兩個生長週期，目前，統計葉數發現可達開花球階段（實生五年生球，每球8 - 10片葉子）[2, 5]之種球比例為，對照組含16.7%，不同濃度處理之azaC部份，約為8.3%以上，不同濃度EMS處理部份也佔有15.9%以上的比例，而不同濃度秋水仙素處理者，則因生育較差，並無達每球8 - 10片葉的階段。所有處理單株的葉數統計，大約介於4 - 7片葉間，比例高達61%以上。對照由處理至種出約兩年半時間證實，經由組織培養、適當肥培與病蟲害防治，可達到縮短該作物的生長週期。探討此一原因，由本試驗出瓶之培植體可見，每球平均有2 - 3片葉子（相當於二年生的實生球）（圖2-A），再經由種植於網室，於適當的肥培管理與病蟲害防治，有效促進植物養分之吸收與光合作用的維持，確保種球的充實，應可縮短田間栽培至開花球的時間。

結　　論

從荷蘭科學家Hugo de Vries於二十世紀初提出人為誘導變異的概念以來[18]，人們期待採用有別於傳統育種之人為誘變方法，進行生物體遺傳變異的研究，並期望育出有用的品種。由於利用化學誘變劑處理植株具有點突變 (point mutation) 發生機率高，染色體受損較低，其變異範圍不同於物理誘變，為其優點[18]，因此在誘變育種上有其特殊價值。本試驗利用三種化學誘變劑，配合組培苗再生技術，除了可加速誘變組培苗的繁殖與再生，更可提高誘變組培苗變異的機率。尤其我們已在誘變組培苗中發現外表型態的變異，並經由聚合酶連鎖反應發現應有分子上的變異。在此基礎上，我們期望能成功篩選優良的金花石蒜誘變株系，有助於金花石蒜產業。

致　　謝

本研究承行政院農業委員會經費補助（計畫編號：88生技-2.1-糧-03(2)、89生技-2.1-糧-03(2)），謹此致謝。

引用文獻

1. 何偉真。1988。植物組織培養在誘變育種上的應用，115-119頁。許麗卿、曾義雄和陳慶三合編。國科會生命科學研究推動中心專刊第十六集：生物技術專題演講論文集(二)。國科會發行，台北，台灣。313頁。
2. 呂美麗。1997。金花石蒜之栽培管理及繁殖技術。農業世界雜誌171: 19-23。
3. 李文權、李素瑩。1992。自交作物與異交作物對不同化學誘變原的誘變效果。農林學報41(3, 4): 27-40。
4. 李寶健、曾慶平。1990。植物的突變細胞系及其利用，256-284頁。李寶健、曾慶平編著。植物生物技術原理與方法。湖南科學技術出版社編印，湖南，中國。491頁。
5. 林定勇、李哖。1997。金花石蒜的開花習性與生理。農業世界雜誌171: 24-30。
6. 黃新川。1987。四、香蕉病害，15-18頁。台灣香蕉研究所年報。台灣香蕉研究所編印，屏東，台灣。66頁。
7. 黃新川。1992。三、香蕉病蟲害，30-32頁。台灣香蕉研究所年報。台灣香蕉研究所編印，屏東，台灣。94頁。
8. 黃麗春、劉定明。1992。金花石蒜的組織培養，116-120頁。園藝作物組織培養實用技術。豐年社編印，台北，台灣。120頁
9. 黃麗春。1997。金花石蒜生長點培養。61-63頁。沈再發、陳駿季和文紀鑾合編。「園藝作物組織培養研究與應用」技術手冊。農林廳種苗改良繁殖場編印，台中，台灣。110頁。
10. 陳淑惠。1997。共築金花石蒜的未來。農業世界雜誌171: 11-14
11. 張銘堂。1996。玉米之遺傳（續）第十一章誘變。科學農業44(1, 2): 37-52
12. 謝順景、謝日鑫。1981。化學誘變劑。79-124頁。謝順景、謝日鑫合譯。誘變育種學。國立編譯館編印，台北，台灣。432頁。
13. Bezdek, M, B., Koukalova, B. Brzobohaty, and B. Vyskot. 1991. 5-Azacytidine-induced hypomethylation of tobacco HRS60

tandem DNA repeats in tissue culture. Planta 184: 487-490.
14. Brochardt, A., L. Hodal, G. Palmgren, O. Mattsson, and F. T. Okkels. 1992. DNA methylation is involved in maintenance of an unusual expression pattern of an introduced gene. Plant Physiol. 99: 409-414.
15. Brown, P. T. H., K. Yoneyama, and H. Lorz. 1989. An investigation into the role of 5-Azacytidine in tissue culture. Theor. Appl. Genet. 78: 321-328.
16. Fields, M. A.1993. Heritable effects of 5-azacytidine treatments on the growth and development of flax (*Linum usitatissimum*) genotrophs and genotypes. Genome 37: 1-11.
17. Fu, R., R. L. Anderson, Z. M. Cheng, and Z. R. Liu. 1995. Studies on induced mutation of fruit trees in vitro. Acta Hort. 403: 111-116.
18. van Harten, A. M. 1998. Mutation Breeding: theory and practical applications. Cambridge University press. UK. 353pp.
19. Heslop-Harrison, J. S. 1990. Gene expression and parental dominance in hybrid plants. Development 1105: 21-28.
20. Jones, P. A., and S. M. Taylor. 1980. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. Cell 20: 85-93.
21. Jones, P. A. 1985. Altering gene expression with 5-azacytidine. Cell 40: 485-486.
22. Karp, A., and S. W. J. Bright. 1985. On the causes and origins of somaclonal variation. In Oxfrod Surveys of Plant Molecular and Cell Biology, vol.2, ed. B. J. Miflin, pp.199-234. Oxford University Press, Oxford.
23. King, G. J. 1995. Morphological development in *Brassica oleracea* is modulated by in vivo treatment with 5-azacytidine. J. Hort. Sci. 70 (2): 333-342.
24. Konzak, C. F., R. A. Nilan, J. Wangner, and R. J. Foster. 1965. Efficient chemical mutagenesis. In The Use of Induced Mutations in Plant Breeding. (Report FAO/IAEA Technical Meeting, Rome, 1964), pp.49-70. Pergamon Press, Oxford.
25. Huang, Li-Chun. 1981. Tissue culture investigations of bamboo (*Bambusoideae, Poaceae*). Doctoral Dissertation, University of California, Riverside, USA.
26. Huang, Li-Chun, and Din-Ming Liu. 1989. Clonal multiplication of *Lycoris aurea* by tissue culture. Scientia Hort. 40: 145-152.
27. Micke, A., and B. Donini. 1993. Induced mutations, pp.52-61. In: Hayward, M.D., N.O. Bosemark, and I. Romagosa. (Eds.) Plant breeding: principles and prospects. Capman and Hall press. Cambridge, UK.
28. Novak, F. J. 1991. *In vitro* mutation system for crop improvement. In Plant Mutation Breeding for Crop Improvement (Proceedings FAO/IAEA Symposium. Vienna. 1990), vol.2, pp. 327-342. IAEA, Vienna.
29. Pandit, N. N., and V. E. A. Russo. 1992. Reversible inactivation of a foreign gene, hph, during the asexual cycle in *Neurospora crassa* transformants. Mol. Gen. Genet. 234: 412-422.
30. Pillips, R. L., S. M. Kaeppler, and P. Olhoft. 1994. Genetic instability of plant cultures: breakdown of normal controls. Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 5222-5226.
31. Sano, H., I. Kamada, S. Youssefian, M. Katsumi, and H. Wabiko. 1990. A single treatment of rice seedlings with 5-azacytidine induces heritable dwarfism and undermethylation of genomic DNA. Mol. Gen. Genet. 220: 441-447.
32. Sano, H., and S. Youssefian. 1991. A novel ras-related *rgp1* gene encoding a GTP-binding protein has reduced expression in 5-azacytidine-induced dwarf rice. Mol. Gen. Genet. 228: 227-232.
33. van Tuyl, J. M., B. Meijer, and M. P. van Dien. 1992. The use of oryzalin as an alternative for colchicine in *in-vitro* chromosome doubling of *Lilium* and *Nerine*. Acta Hort. 325: 625-630.

Study on the Mutation in *Lycoris aurea via* Chemical Mutagen Treatment [1]

Wha-Shin Hsu[2], Li-Chun Huang[3], Pan-Chi Liou[2], Yin-Huay Cheng[2], You-Ming Chang[2] and Chi-Hsiung Hsiao[2]

Summary

Lycoris aurea is an important native tuberous flowering plant in Taiwan. People are favorably impressed with its noble and attractive flowers. Unfortunately, owing to less genetic variability, *L. aurea* has only little color diversities and almost only one unique flower type can be seen in the market. We are trying to solve this problem through artificial mutagenesis. In December 1997, we treated bud primordia of *in vitro* shoot with chemical mutagens, including 5-azacytidine (5-Ac), ethyl methane sulfonate (EMS), and colchicine. The various concentrations and exposure duration were used including one day immersion separately in 0.05, 0.5, 5, and 50mM 5-azacytidine; one hour treatment in 0.1, 0.2, or 0.5% EMS suspension; and 0.1 and 0.2% colchicine separately for one and four days exposure. Besides we repeated the cochicine treatments (0.05, 0.1, 0.2% colchicine for 1, 2, 4 days immersion) in May 2000. In this study we found an increase of the concentrations of various chemical mutagens along with a greater toxicity and lethality in the mutagen-treated explants. The highest regeneration ratio (52%) was found in 0.5 mM azaC for 1-day treatment and the lowest ratio (2.5%) was found in 0.2% colchicine for 1-day treatment in the former experiment one month after treatments. The major phenotypic variations appeared in cultured mutant including etiolated leaves base, curve and thicken leaves. The variation ratio of cultured mutant were over 50% for all treatments, even the CK (without any chemical treatment) also has 5% somaclonal variation. Mutants with variegated and etiolated leaves were found in 0.5mM azaC for 1-day treatment after transplanting to field. No differences in chromosome number (2n = 2x = 14) in the former experiment were found however a ploidy chimeras were found in the later experiment (such as 2n = 10x - 2 = 68 in 0.2% colchicine for 4 days treatment). According to the cytological data, it revealed that something changed in genomic DNA level. The morphological changes on flower color and types have not yet collected since it took 4 - 5 years for growing the flowering bulbs. We hope that using this approach the efficiency of variety improvement on *L. aurea* could significantly enhance, therefore benefiting the development of the *L. aurea* industry.

Key words : *Lycoris aurea* Herb., Chemical mutagen, 5-Azacytidine (azaC), Ethyl methane sulfonate (EMS), Colchicine, Chromosome analysis.

---

1. Contribution No. 2069 from Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture.
2. Respectively, Assistant, Associate Researcher, Assistant Researcher, Assistant Researcher, Senior Horticulturist and Head, Department of Horticulture, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Researcher, Institute of Botany, Academia Sinica, Nankang, Taipei, Taiwan, ROC.